

D E 694 12 790 (EP 0 680 515 B1)

Abstract not available for D E 694 12 790

Abstract of corresponding document: **W09417202**

A method for determining the presence and/or amount of microorganisms and/or their intracellular material present in a sample comprising estimating the amount of adenylate kinase therein by its ability to convert adenosine diphosphate (ADP) to adenosine triphosphate (ATP) and relating that to the presence/or amount of organism and/or intracellular material. The method provides improved sensitivity over existing luciferase/luciferin assays. Reagents including purified ADP and adenyly kinase free luciferase are provided together with test kits including these and apparatus for automated operation of the method.



⑲ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Übersetzung der
europäischen Patentschrift**

②⑦ **EP 0 680 515 B 1**

⑩ **DE 694 12 790 T 2**

⑤① Int. Cl.⁶:
C 12 Q 1/04
C 12 Q 1/48
C 12 Q 1/66

②①	Deutsches Aktenzeichen:	694 12 790.6
②⑤	PCT-Aktenzeichen:	PCT/GB94/00118
②⑧	Europäisches Aktenzeichen:	94 904 295.6
②⑦	PCT-Veröffentlichungs-Nr.:	WO 94/17202
②⑧	PCT-Anmeldetag:	21. 1. 94
②⑦	Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung:	4. 8. 94
②⑦	Erstveröffentlichung durch das EPA:	8. 11. 95
②⑦	Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA:	26. 8. 98
④⑦	Veröffentlichungstag im Patentblatt:	11. 2. 99

③① Unionspriorität:
9301118 21. 01. 93 GB

⑦③ Patentinhaber:
The Secretary of State for Defence in Her Majesty's
Government of the United Kingdom of Great Britain
and Northern Ireland, London, GB

⑦④ Vertreter:
Beetz und Kollegen, 80538 München

⑧④ Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, IE, IT, LI, NL, PT, SE

⑦② Erfinder:
SQUIRRELL, David James, Salisbury, Wiltshire SP4
0JQ, GB

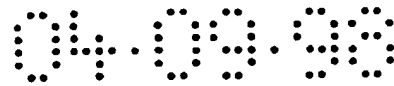
⑤④ **MIKROBIOLOGISCHES TESTVERFAHREN UND REAGENZIEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 694 12 790 T 2

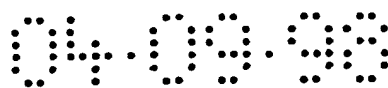
DE 694 12 790 T 2



Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren für den Nachweis von Mikroorganismen, eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens und Test-Kits, die die wesentlichen Reagenzien zur Durchführung des Verfahrens enthalten.

In allen Lebewesen dient Adenosintriphosphat (ATP) als Quelle für chemische Energie, und es ist bekannt, dies unter Verwendung der durch ATP angetriebenen Luciferase/Luciferin-Reaktion zu untersuchen bzw. quantitativ zu bestimmen. Das durch diese Enzymreaktion erzeugte Licht kann unter Verwendung eines Luminometers gemessen und mit der Menge des vorhandenen ATPs in Verbindung gebracht werden. Die Brauchbarkeit von ATP als Maß für die Zahl der Mikroorganismen ist seit Mitte der 60er Jahre bekannt (siehe ATP Luminescence Rapid Methods in Microbiology (1989), Hrsg. Stanley et al.; Blackwell Scientific Publications, London, siehe S. 1-10), wobei die wesentlichen Vorteile in der Schnelligkeit und der Empfindlichkeit bestehen. Bei Verwendung dieses Testformats können einfache Proben innerhalb weniger Minuten analysiert werden, während komplizierte Proben routinemäßig nur eine halbe Stunde erfordern, wobei die Nachweisgrenze bis hinunter zu einer ATP-Konzentration von 10^{-12} mol/l reicht. Es gibt jedoch einen Bedarf an Verfahren, die noch empfindlicher sind, wenn Mikroorganismen oder deren Inhaltsstoffe nachgewiesen werden sollen, bei gleichzeitig unveränderter Geschwindigkeit und einfacher Ausführbarkeit.

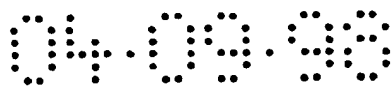
Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben festgestellt, daß die Geschwindigkeit und die Empfindlichkeit dieses auf ATP basierenden Verfahrens deutlich erhöht werden können, wenn anstelle von ATP das ATP-erzeugende Enzym, Adenylatki-



nase als Zielmolekül der quantitativen Bestimmung verwendet wird. Adenylatkinase ist ein Enzym, das von allen Organismen für die Umwandlung von Adenosindiphosphat (ADP) in Adenosintriphosphat (ATP) verwendet wird. Die Ausrichtung der Messung auf dieses Enzym anstelle von ATP unter Verwendung des bevorzugten erfindungsgemäßen Verfahrens, der bevorzugten erfindungsgemäßen Vorrichtung und der bevorzugten erfindungsgemäßen Kits läßt den Nachweis bis mindestens hinunter zu 10^{-20} mol der als intrazellulärer Marker dienenden Adenylatkinase zu.

Es ist bekannt, Adenylatkinase unter Verwendung des Luciferase/Luciferin-Systems zu untersuchen (siehe Brolin et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 1 (1979) 163-169) mit dem Ziel, deren Aktivität in bestimmten Geweben von Säugern und Pflanzen zu bestimmen (Rodionova et al. Fisiolgiya Rastenii (1978), 25, 4, S. 731-734 für Pflanzen). Die Verwendung eines derartigen Untersuchungssystems für den Nachweis von Mikroorganismen ist jedoch noch nicht vorgeschlagen worden, und die Vorteile einer derartigen Vorgehensweise, d.h. die dadurch ermöglichte erhöhte Empfindlichkeit, waren für die, die das Enzym selbst untersucht haben, ohne Bedeutung.

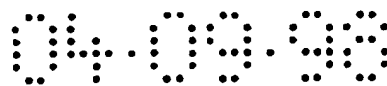
Obwohl Adenylatkinase in kleineren Mengen als ADP oder ATP vorhanden ist, bewirkt seine Verwendung als biologischer Marker für Mikroorganismen eine erhöhte Empfindlichkeit mit einer typischerweise erreichbaren Verstärkung von 400 000, indem seine Gegenwart durch das von ihm erzeugte ATP gemessen wird, denn pro Mol vorhandenes Enzym werden während einer 10minütigen Inkubation 400 000 mol ADP in ATP umgewandelt. Die Abschätzung des Enzyms durch Messung des Substrats des Produkts der Reaktion, die durch das Enzym katalysiert wird, ermöglicht den Nachweis bis hinunter zu 10^{-20} mol.



Nach einem ersten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren für den Nachweis der Gegenwart und/oder der Menge von Mikroorganismen und/oder des intrazellulären Materials dieser Mikroorganismen in einer Probe angegeben, bei dem die Menge der darin enthaltenen Adenylatkinase nachgewiesen und/oder abgeschätzt wird, indem die Fähigkeit von Adenylatkinase, Adenosindiphosphat (ADP) in Adenosintriphosphat (ATP) umzuwandeln, verwendet wird, und bei dem dies mit der Gegenwart oder der Menge an Mikroorganismen und/oder an intrazellulärem Material dieser Mikroorganismen in Zusammenhang gebracht wird. Die Umwandlung wird durch Zugabe von ADP zu den Proben ermöglicht.

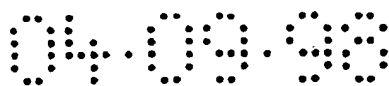
Adenosintriphosphat (ATP) wird vorzugsweise unter Anwendung des Luciferin/Luciferase-Systems nachgewiesen, das ein photometrisch nachweisbares Signal liefert, das die in der Probe enthaltene Menge ATP anzeigt. Luciferin/Luciferase-Zubereitungen und Verfahren zur Verwendung dieser Zubereitungen bei der Untersuchung von ADP sind dem Fachmann wohl bekannt und im Handel erhältlich (siehe z.B. Brolin et al.). Eine typische Zubereitung enthält z.B. 0,1 bis 10 mg Luciferase pro Liter, 15 bis 1000 μmol D-Luciferin pro Liter und Stoffe wie MgCl_2 , EDTA, RSA (Rinderserumalbumin) und einen Puffer für pH 7 (siehe z.B. EP 054676).

Wie bei jeden sonstigen unter Verstärkung ablaufenden Test (Untersuchung) wird die Empfindlichkeit des erfindungsgemäßen Adenylatkinase-Bestimmungsverfahrens durch die Reinheit der Reagenzien begrenzt. Im vorliegenden Fall stellen ATP in dem ADP-Substrat und Adenylatkinase in der Luciferase-Zubereitung die wesentlichen Verunreinigungen dar. Für die Verwendung als empfindlicher Test auf Mikroorganismen, insbesondere dann, wenn diese möglicherweise gesundheitsschädlich sind und in geringer Zahl nachgewiesen werden müssen,



ist es erforderlich, daß die Reinheit jedes Reagens so hoch wie möglich ist in bezug auf die Substanz, mit der das jeweilige Reagens in dem Untersuchungsverfahren reagieren soll.

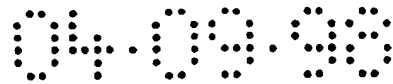
Um diesem ersten Problem zu begegnen, wird vorzugsweise im Handel erhältliches ADP hoher Reinheit (Reinheit > 99,5 %) nach einer weiteren Reinigung durch Säulenchromatographie verwendet. Dies ist wünschenswert, da selbst geringe Mengen verunreinigenden ATPs ausreichen können, um ein kräftiges Hintergrundsignal hervorzurufen. Beispielsweise wird bei Verwendung einer Diethylenaminoethylcellulose-Säule und von 0,02 mM Chlorwasserstoffsäure als Elutionsmittel ATP so viel langsamer von der Säule eluiert als ADP, daß eine ausreichende Trennung möglich ist. Andere Kombinationen aus Chromatographie-Materialien und Elutionsmitteln können ebenfalls unter Erzielung ähnlicher Ergebnisse verwendet werden. Die ersten Fraktionen mit einem hohen ADP/ATP-Verhältnis werden für die Verwendung aufbewahrt. Die Reinheit wird anhand der Biolumineszenz durch das Luciferin/Luciferase-Reagens nach Einwirkung von Adenylatkinase zur Messung der ADP-Menge und ohne Adenylatkinase zur Messung der Menge an verunreinigendem ATP bewertet. Bei einem weiteren Verfahren zur Entfernung von ATP aus dem ADP-Substrat werden Enzyme verwendet, die ATP spezifisch abzubauen vermögen, wie z.B. Luciferase oder Apyrase. Derartige Enzyme können auch für die weitere Reinigung von chromatographisch gereinigtem ADP verwendet werden, oder alternativ kann enzymatisch gereinigtes ADP säulenchromatographisch behandelt werden. Es wird darauf hingewiesen, daß Apyrase auch eine ADPase darstellt, da sie jedoch gegenüber ATP eine größere Aktivität zeigt und da ADP in sehr viel größeren Mengen enthalten ist, stellt dies kein größeres Problem dar.



Das zweite Problem betrifft die Adenylatkinase, die, da es sich um ein essentielles "housekeeping"-Enzym handelt, in allen Organismen und im allgemeinen in Luciferase-Zubereitungen enthalten ist. Es kann sich hierbei um eine nur geringfügige Verunreinigung handeln, da jedoch das Ziel darin besteht, geringe Mengen Adenylatkinase in den Proben zu messen, kann seine Gegenwart in der Luciferase einen einschränkenden Faktor darstellen.

Das Molekulargewicht der Luciferase und der Adenylatkinase sind mit 61kD bzw. 21kD ausreichend verschieden. Außerdem ist Luciferase relativ hydrophob, wohingegen Adenylatkinase als lösliches Enzym vorkommt. Es ist demzufolge möglich, die Adenylatkinase aus den Luciferase-Zubereitungen zu entfernen, z.B. durch Größen-Ausschluß-Chromatographie, Umkehrphasen-Chromatographie oder durch beide Chromatographien. Wahlweise oder zusätzlich hierzu kann das Problem der Verunreinigung der Luciferase mit Adenylatkinase dadurch verhindert werden, daß die Biolumineszenz-Reagenzien (Luciferase und Luciferin) unmittelbar vor oder während der Durchführung der Messungen zugegeben werden, so daß die verunreinigende Adenylatkinase nicht genügend Zeit für die Erzeugung eines merklichen Effekts hat.

Damit die gesamte von einem zu untersuchenden Mikroorganismus stammende Adenylatkinase den erfindungsgemäßen ADP- und Luciferase/Luciferin-Testreagenzien verfügbar gemacht werden kann, ist es erforderlich, die Mikroorganismen zu zerstören, damit das intrazelluläre Material freigesetzt oder den Reagenzien in anderer Weise ausgesetzt wird. Diese Zerstörung kann mit mechanischen Einrichtungen, wie z.B. einem Ultraschall-Generator, durch osmotischen Schock, wahlweise in Kombination mit einem Kälteschock oder mit Reagenzien wie Lysozym, oder einfacher durch Verwendung von grenzflächenaktiven Stoffen erfolgen. Derartige grenzflächenaktive



Stoffe sind im Handel erhältlich und werden üblicherweise als "Extraktionsmittel" bezeichnet. Typische Extraktionsmittel sind nicht rechtlich geschützte kationische grenzflächenaktive Stoffe wie CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid) und geschützte Stoffe, wie z.B. Enzymatics[®] ATP-freisetzendes Mittel, Biotrace[®] XM Extraktionsmittel (von Biotrace, Bridgend, Vereinigtes Königreich, im Handel erhältlich) und Lumac[®] NRM (nucleotide releasing agent, von Lumac BV, Holland, im Handel erhältlich). Bei Verwendung von CTAB enthält eine geeignete Zubereitung 0,01 bis 1 % CTAB in Wasser, z.B. 0,2 %, andere Konzentrationen können jedoch ebenfalls vom Fachmann gewählt werden.

Demnach werden Mikroorganismen, deren Vorhandensein in einer zu untersuchenden Probe vermutet wird, vorzugsweise vor der Zugabe von ADP und Luciferase/Luciferin-Reagenzien unter Verwendung von zerstörenden Reagenzien aufgeschlossen, um den Lumineszenz-Reagenzien den Zellinhalt zugänglich zu machen. Wenn der Wunsch besteht, die zu untersuchenden Zellen von anderen Zellen wie z.B. den Zellen von Pilzsporen zu unterscheiden, ist es möglich, zwei getrennte Untersuchungen durchzuführen, wobei bei der einen Untersuchung eine Behandlung mit einem nichtionischen grenzflächenaktiven Stoff stattfindet, der nur diese Sporen und mehrzellige "somatische" Tierzellen zu zerstören vermag (z.B. Triton[®] TX-100), und bei der anderen Untersuchung eine Behandlung mit einem der oben beschriebenen kationischen grenzflächenaktiven Stoffe oder "Extraktionsmittel" zur Zerstörung aller Zellen durchgeführt wird. Es ist möglich, diese beiden Untersuchungen mit der gleichen Probe durchzuführen, wenn eine ATPase, wie z.B. Apyrase, zwischen den Meßzyklen mit grenzflächenaktivem Stoff und Luciferase zugegeben wird, wobei in dem einen Zyklus ein nichtionischer grenzflächenaktiver Stoff und in dem anderen ein kationischer grenzflä-



chenaktiver Stoff in einem ersten Zyklusschritt verwendet werden.

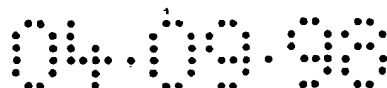
Die erfindungsgemäße Vorrichtung ist dadurch gekennzeichnet, daß sie Mittel zur Aufnahme einer Probe, die auf die Gegenwart von Mikroorganismen in einer wäßrigen Suspension dieser Probe analysiert werden soll, Mittel für die Zugabe von ADP, Luciferase und Luciferin zu der Suspension und Mittel für den Nachweis des erzeugten Lichts umfaßt. Die Vorrichtung weist vorzugsweise Mittel für die Zugabe von grenzflächenaktiven Stoffen zu der Suspension auf, die vor den Mitteln für die Zugabe von Luciferase und Luciferin angeordnet sind. ADP wird vorzugsweise vor der Luciferase und Luciferin zugegeben, z.B. mit dem grenzflächenaktiven Stoff, damit genügend Zeit für die Erzeugung von ATP bleibt, es können jedoch auch alle Reagenzien zusammengegeben werden, wenn Glimmkinetiken (glow kinetics) verwendet werden. Das/die Luciferase/Luciferin-Reagenz(ien) ist/werden vorzugsweise getrennt vom ADP zugegeben.

Die Vorrichtung umfaßt vorzugsweise Nachweismittel für die Bestimmung der bei Zugabe von Luciferase und Luciferin von der Suspension emittierten Lichtmenge, sie umfaßt vorzugsweise einen Computer und eine optische Anzeigeeinheit für die Aufnahme der von der Nachweiseinrichtung gelieferten Signale, die die Information über die emittierte Lichtmenge enthalten, für die Berechnung der möglichen Gegenwart von Mikroorganismen und der enthaltenen Menge an Mikroorganismen aus diesen Signalen und für die Anzeige der Ergebnisse. Die Berechnung kann durch Programmieren des Rechners vereinfacht werden, um eine festgelegte Reihenfolge eintreffender Signale berücksichtigen zu können, von denen einige Kontrollsignale sind, einschließlich Durchläufe mit Leerproben oder Durchläufe mit nichtionischem grenzflächenakti-

ven Stoff, oder um voreingestellte Standardwerte, wie z.B. die Temperatur, berücksichtigen zu können.

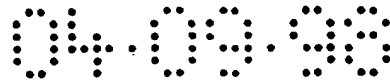
Eine bevorzugte Vorrichtung umfaßt die Probe haltende Fördermittel, die flüssige Medien bei einer oder mehreren Reagenzabgabestationen auf dem Weg zu den Lichtnachweismitteln aufnehmen. Beispielsweise nimmt das Fördermittel eine Reihe von Probengefäßen auf, vorzugsweise Luminometrie-Gefäße, in die vorab ein Phosphatpuffer gefüllt wird, die eine wäßrige flüssige Suspension des auf das Vorhandensein von Mikroorganismen zu testenden Materials enthalten, oder die eine Station der Vorrichtung passieren, bei der eine solche Suspension in die Probengefäße gegeben wird. Die Gefäße können beispielsweise offen sein, mit einem Deckel versehen werden und danach auf den Fördermitteln zu einer Station für die Zugabe des grenzflächenaktiven Stoffs, zu Stationen für die Zugabe von ADP und Luciferase/Luciferin und anschließend durch eine Station, in der das Licht detektiert wird, geführt werden. Die Lichtnachweiseinrichtung kann ein Standard-Luminometer sein, z.B. ein Gerät vom Typ Biotrace Multi-lite oder Biotrace M3.

Das Licht kann durch Verweilen des Probenvolumens, z.B. eines Luminometer-Röhrchens, innerhalb des Lichtdetektors unmittelbar nach oder gleichzeitig mit der Zugabe der Luciferase und des Luciferins gemessen werden. So werden bei einer bevorzugten Vorrichtung die Luminometrie-Reagenzien unmittelbar vor dem Eintreten in die oder innerhalb der Lichtdetektions-Station zugegeben. Eine bevorzugte Vorrichtung mißt das emittierte Licht unmittelbar nach Zugabe der Reagenzien und dann wieder nach einem vorgegebenen Zeitraum. Alternativ wird das emittierte Licht während eines geeignet langen Zeitraums gemessen, so daß das Licht beispielsweise dort, wo Glimmkinetiken verwendet werden, kumulativ ausgewertet werden kann.



Der erfindungsgemäße Test-Kit umfaßt die wesentlichen Reagenzien, die für das erfindungsgemäße Verfahren erforderlich sind, d.h. Adenosindiphosphat zusammen mit Luciferase und Luciferin. Der Kit enthält vorzugsweise all diese Reagenzien, wobei die Luciferase und das Luciferin als eine einzige Reagenzienlösung bereitgestellt werden und wobei der Kit einen weiteren grenzflächenaktiven Stoff enthält, der zum Zerstören der zu untersuchenden Zellen (Zielzellen), für die der Test vorgesehen ist, geeignet ist. Üblicherweise sind für die Bestimmung der Mikroorganismen nur kationische grenzflächenaktive Stoffe erforderlich, wohingegen in den Fällen, in denen Pilzsporen und somatische Zellen möglicherweise von Bedeutung sind, ein weiterer nichtionischer grenzflächenaktiver Stoff als Reagens beigelegt werden kann, um die Zahl dieser Sporen und Zellen zu ermitteln. Der Kit liegt in Form einer kompletten Liefereinheit vor, die vorzugsweise eine Gebrauchsanleitung für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens enthält; die Reagenzien können in Vorratsbehältern und in einer Konzentration bereitgestellt werden, in der die Reagenzien unmittelbar verwendet werden können oder bei denen eine Verdünnung erforderlich ist.

Ein bevorzugter erfindungsgemäßer Test-Kit umfaßt ein ADP-Reagens, dessen Reinheit größer als 99,5 % ist, und ein Luciferase-Reagens, das im wesentlichen frei von Adenylatkinase-Aktivität ist. Alternativ ist das verwendete Luciferase/Luciferin-Verhältnis, wie es sich aus der Gebrauchsanleitung des Kits und/oder aus den relativen Konzentrationen ergibt, so groß, daß die Luciferase so schnell auf das Luciferin-Substrat einzuwirken vermag, daß die mit der Luciferase assoziierte Adenylatkinase ATP erst nach Beendigung der Messung der ersten Lichtemission erzeugt.



Die bevorzugten gereinigten Reagenzien können gemäß den oben beschriebenen Verfahren bereitgestellt werden. Es wird darauf hingewiesen, daß die Adenylatkinase-Aktivität in der Luciferase durch Stehenlassen der Luciferase über einen Zeitraum von Monaten oder Jahren entfernt werden kann.

Die Verfahren, die Vorrichtung, die Reagenzien und die Kits der vorliegenden Erfindung werden anschließend beispielhaft unter Bezugnahme auf die folgenden, nicht einschränkenden Beispiele und Figuren veranschaulicht. Weitere Ausführungsformen der Erfindung ergeben sich für den Fachmann im Lichte dieser Beispiele.

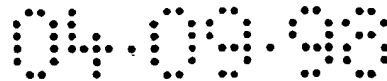
FIGUREN

Figur 1 zeigt ein Diagramm, in dem die zunehmende Zahl der in einem Luminometer pro Minute gemessenen Zählimpulse für verschiedene Mengen *E. coli*, die gemäß Beispiel 4 und Beispiel 5 untersucht wurden, aufgetragen ist.

Figur 2 zeigt eine schematische Darstellung der Vorrichtung gemäß Beispiel 6.

Beispiel 1: Herstellung eines Reagens aus gereinigtem Adenosindiphosphat

Für die weitere Reinigung von im Handel erhältlichem ADP hoher Reinheit (>99,95 %) (von Sigma) wurde Flüssigkeitschromatographie verwendet. Aus 10-ml-Einweg-Plastikspritzen wurden kleinen Säulen erzeugt, und in diesen Säulen wurde kreisrundes Glasfaserfilterpapier (Whatman GF/A) angeordnet, um deren Auslässe zu bedecken. Das Chromatographiemedium, Diethylaminoethylcellulose (Whatman DE-52), wurde vorsichtig in jede Säule gegossen und Absetzen gelassen unter Erhalt eines Füllvolumens von etwa 4 ml. Ein weiteres

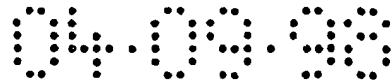


kreisförmiges Glasfaserfilterpapier wurde auf der gepackten Säule angeordnet.

Nach Waschen der Säule mit etwa 15 ml Elutionsmittel (0,02 M HCl), wurden 100 mM ADP hoher Reinheit in etwa 0,5 ml 0,02 M HCl aufgebracht und die Elution mit 0,02 M HCl bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml pro Minute durchgeführt. Fraktionen mit einem Volumen von 3 bis 4 ml wurden in Einwegplastikküvetten gesammelt, in denen die optische Dichte und damit die ADP-Menge bequem (bei 265 nm) gemessen werden konnten. Die ersten Fraktionen mit einem hohen ADP/ATP-Verhältnis wurden für die Anwendung aufbewahrt.

Zur Überprüfung der erfolgreichen Durchführung dieser Reinigung wurden im Handel erhältliche Luciferin/Luciferase-Zubereitungen (Enzymatix, Cambridge, Vereinigtes Königreich und HM von Biotrace, Bridgend, Vereinigtes Königreich) nach der Gebrauchsanleitung der Hersteller zum Nachweis der vorhandenen ATP-Menge verwendet. Ähnliche Tests wurden in Gegenwart von Adenylatkinase zur Bestimmung des ADP-Gehalts durchgeführt.

50 µl einer 1/3000-Verdünnung von im Handel erhältlichem 100 mM ADP hoher Reinheit (Sigma) lieferten ein Luminometer-Meßergebnis von 8 919 Zählimpulsen, hierbei handelt es sich um ein Maß für das Ausmaß der Verunreinigung mit ATP. Nach Inkubieren der gleichen Probe mit 100 femtomol Adenylatkinase wurde ein Meßergebnis von 1 370 839 Zählimpulsen erhalten, bei dem es sich um ein Maß für die ADP-Menge handelt. Eine säulenchromatographisch gereinigte Fraktion, die von dieser ADP-Lösung stammt, ergab 223 Zählimpulse als ATP-Meßergebnis und 1 442 054 Zählimpulse als Adenylatkinase-Meßergebnis unter den gleichen Bedingungen. Das Si-



gnal/Hintergrund-Verhältnis wurde in diesem Fall von 153 auf 6466 verbessert.

Beispiel 2: Alternative Zubereitung eines Adenosindiphosphat-Reagens

ADP hoher Reinheit wurde durch Einwirken von Apyrase auf das verunreinigende ATP weiter gereinigt. 0,1 mM-Lösungen wurden mit ADP hergestellt, das aus zwei verschiedenen Quellen stammte. Das eine ADP (A) war als 98%ig rein und das andere ADP (B) als 99%ig rein im Handel erhältlich. Im Handel erhältliche Luciferin/Luciferase-Zubereitungen wurden zur Bestimmung des ATPs verwendet, wobei die mit dem Luminometer gemessenen Zählimpulse für Probe A 54 768 und für Probe B 305 500 betrugen. 8 µl einer Apyrase-Lösung mit 100 E pro Milliliter (Kartoffelapyrase von Sigma) wurden dann zu 10 ml 0,1 mM-Lösungen von A und B gegeben. Nach etwa 22 h dauerndem Inkubieren bei Raumtemperatur, wonach die Lösungen zur Zersetzung der Apyrase zum Sieden erhitzt wurden, wurden Luminometer-Meßergebnisse von 5 100 Zählimpulsen für A und 6 600 Zählimpulsen für B erhalten, die eine deutliche Abnahme der Menge an verunreinigenden ATP zeigen.

Beispiel 3: Bewertung der Untersuchung freier Adenylatkinase

Für die quantitative Untersuchung vorgesehene Adenylatkinase-Stammlösungen wurden in phosphatgepufferter Kochsalzlösung von pH 7,2, die 1 % RSA (Rinderserumalbumin) und 0,25 % Triton X-100 enthält, hergestellt. Die Untersuchung wurde in Einwegplastikröhrchen (Inhalt 3 ml) durchgeführt, die für Luminometrie geeignet sind. 200 µl Trispuffer von pH 7,8 wurden in die Röhrchen pipettiert, wonach 100 µl etwa 1 mM ADP (gereinigt wie zuvor beschrieben) zugegeben wurden. Zum Starten der Umsetzung wurden 10 µl Adenylatki-

nase, die in Trispuffer von pH 7,8 verdünnt waren, zugegeben. Der Röhrcheninhalt wurde unter Verwirbelung gemischt und zum Inkubieren bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach 10minütigem Inkubieren wurden 100 bis 150 μ l Luciferin/Luciferase-Reagens zugegeben, und unmittelbar danach wurde in ein Luminometer das emittierte Licht gemessen, das aufgrund von ATP, das durch die Aktivität der Adenylatkinase gebildet wird, erzeugt wird (siehe Tabelle 1).

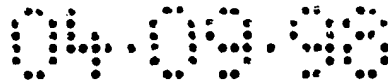
Es wird darauf hingewiesen, daß die Empfindlichkeit des Bestimmungsverfahrens durch Verwendung höherer ADP-Konzentrationen in dem Reaktionsmedium erhöht werden kann, da der K_m -Wert der Adenylatkinase im Millimol-Bereich liegt. Im Handel erhältliches ADP, das beträchtliche ATP-Mengen enthält, macht die Verwendung derartiger millimolarer ADP-Mengen unerwünscht, durch die Verwendung des erfindungsgemäßen gereinigten ADPs kann jedoch eine derartige Zunahme mit den damit verbundenen Vorteilen erreicht werden. Auch durch eine zunehmende Inkubationszeit kann die Empfindlichkeit erhöht werden.

Unbekannte Adenylatkinase-Konzentrationen wurden unter Bezugnahme auf eine Eichkurve, die einen Zusammenhang zwischen bekannten Adenylatkinase-Konzentrationen und während 10minütigem Inkubieren erzeugtem ATP herstellt, abgeschätzt. Aufgrund der Empfindlichkeit des Bestimmungsverfahrens ist es wünschenswert, Schutzmaßnahmen vor zufälligen Verunreinigungen mit ATP oder Adenylatkinase zu treffen. Die quantitativen Bestimmungen sollten möglichst in einer Flow-box mit laminarer Strömung unter Verwendung von ATP-freien Lösungen, Einweggummihandschuhen und Verbrauchsmaterialien aus Kunststoff mit niedrigem ATP-Gehalt durchgeführt werden.

Tabelle 1: Zusammenhang zwischen der nachgewiesenen ATP-Menge und der enthaltenen Adenylatkinase-Menge (AK): Die Verstärkung entspricht der während 10minütigem Inkubieren pro Mol AK gebildeten ATP-Menge

AK (mol)	gebildetes ATP (pmol)	Verstärkung
1 femtomol	322	320000
500 attomol	235	470000
250 attomol	97,5	390000
125 attomol	55,2	440000
62 attomol	26,5	420000
31 attomol	12,7	400000
16 attomol	5,7	360000
8 attomol	3,9	500000
4 attomol	2,1	540000
2 attomol	0,8	410000
1 attomol	0,6	610000
0,5 attomol	0,3	610000

Es zeigt sich, daß dann, wenn Adenylatkinase zur Bestimmung von möglicherweise enthaltenen speziellen Organismen verwendet wird, die quantitative Bestimmung verbessert werden kann, wenn der angenommene Adenylatkinase-Gehalt abgeschätzt wird. Demnach könnten Eichkurven, die unter Verwendung des speziellen zu untersuchenden Organismus erzeugt werden, am besten verwendet werden.



Beispiel 4: Untersuchung von *E. coli*

Eine 1 Woche alte *E.-coli*-Kulturbrühe, die etwa $2,2 \cdot 10^7$ Mikroorganismen pro 200 μ l phosphatgepufferter Kochsalzlösung von pH 7,4 enthielt, wurde als Stammbrühe verwendet und in aufeinanderfolgenden Schritten jeweils um Faktor 10 mit diesem Puffer unter Erhalt einer Reihe von Proben mit 10^7 bis 0,1 Organismen pro 200- μ l-Probe verdünnt.

Jede 200- μ l-Probe wurde in ein Luminometer-Röhrchen (Inhalt 3 ml) gegeben, wonach 10 μ l 1 mM ADP und 100 μ l 0,1%ige wäßrige Cetyltrimethylammoniumbromid-Lösung zugegeben wurden. Das resultierende Gemisch ließ man 1 min bei Raumtemperatur inkubieren. Nach dem Inkubieren wurden 100 μ l gealtertes Biotrace HM (2 Jahre alt, ohne nachweisbare Adenylatkinase-Aktivität) zugegeben, und das emittierte Licht wurde während eines ersten Intervalls von 10 s, dann während weiterer 10-s-Intervalle bis zu einer Gesamtzeit von 1 min gemessen, um die Zunahme des Lichts in kumulierender Weise unter Verwendung eines Biotrace-M3-Luminometers zu bestimmen. Der erste Signalwert wurde von dem am Ende abgelesenen Wert abgezogen, um ein Maß für das Signal in Zählimpulsen pro Minute zu erhalten.

Zählergebnisse oberhalb der Kontrolle, die während des einminütigen Inkubierens erhalten wurden, variierten mit der Zahl der *E.-coli*-Bakterien in folgender Weise: 10^6 - 39297 cpm (counts per minute = Zählimpulse pro Minute); 10^5 - 3199 cpm; 10^4 - 189 cpm; 10^3 - 67 cpm; 10^2 - 26 cpm. Weitere Ergebnisse werden in Fig. 1 gezeigt.

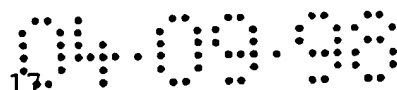
Es ist bekannt, daß das Extraktionsmittel beträchtliche Auswirkungen auf das Luciferase/Luciferin-System hat (siehe z.B. Simpson et al. (1991), J. Biolumin. Chemilumin. 6(2),

S. 97-106), wobei ebenfalls bekannt ist, daß kationische grenzflächenaktive Stoffe die Reaktion verstärken, jedoch eine zunehmende Inaktivierung der Luciferase hervorrufen, daß anionische grenzflächenaktive Stoffe die Umsetzung hemmen und nichtionische und zwitterionische grenzflächenaktive Stoffe über einen großen Bereich verstärkend wirken. Zur Beurteilung der Auswirkungen der grenzflächenaktiven Stoffe auf die mit Adenylatkinase durchgeführte Untersuchung von *E.-coli*-Zellen wurde das oben verwendete Protokoll insoweit abgeändert, als verschiedene "Extraktionsmittel" für die Untersuchung (Bestimmung) von 10^7 *E.-coli*-Zellen in 200 µl phosphatgepufferter Kochsalzlösung verwendet wurden.

Die höchsten Meßergebnisse wurden bei Verwendung von Lumac NRM erhalten, während mit CETAB 226 924 cpm und zwei weiteren Extraktionsmitteln 79 280 bzw. 29 280 cpm erhalten wurden. Dies stellt im Lichte der Ergebnisse von Simpson et al. im Hinblick auf die schädlichen Auswirkungen kationischer und anionischer grenzflächenaktiver Stoffe auf Luciferase kein überraschendes Ergebnis dar; es wird als wahrscheinlich angenommen, daß diese Reagenzien, die zur Verwendung für die ausschließlich mit Luciferase/Luciferin durchgeführte ATP-Bestimmung vorgesehen sind, auf Adenylatkinase eine hemmende Wirkung ausüben.

Beispiel 5: Lokalisierung der bei der *E.-coli*-Untersuchung nachgewiesenen Adenylatkinase

Für die Lokalisierung der bei der Untersuchung in Beispiel 4 nachgewiesenen Adenylatkinase wurde die Zahl der Zählimpulse pro Minute ermittelt, die bei Verwendung von frischen nicht gewaschenen *E.-coli*-Zellen, von frischen gewaschenen Zellen, von Zellen, die drei Tage bei 37 °C gelagert wurden und nicht gewaschen waren, und des Medium frischer Zellen als Probe erhalten wurde. Die Ergebnisse dieser Untersu-

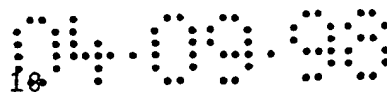


chungen haben gezeigt, daß die meiste Adenylatkinase intrazelluläre Adenylatkinase ist, wobei weniger als 10 % in das Medium freigesetzt werden, und daß die Adenylatkinase-Menge nicht merklich mit dem Alter der Zellen variiert (siehe Figur 1).

Beispiel 6: Erfindungsgemäße Vorrichtung

Eine erfindungsgemäße Vorrichtung besteht aus einem Karussellwagen (1) mit Einbaugestell als Haltevorrichtung für offene, mit Deckel versehbare Luminometer-Röhrchen (2), mit einer bestimmten Zahl von Stationen für die Zugabe von Reagenzien, die an verschiedenen Stellen in Bewegungsrichtung des Karussellwagens angeordnet sind. Zu Beginn eines Durchlaufs werden Luminometer-Röhrchen (2), die zu untersuchende Proben enthalten, in den Karussellwagen eingesetzt und zu einer ersten Station bewegt, an der computergesteuerte Peristaltikpumpen (3) eine Versorgungseinrichtung mit kationischem grenzflächenaktiven Stoff (4) und ADP-Reagens (5) betätigen zur Abgabe der erforderlichen 100 µl bzw. 10 µl. Der Karussellwagen befördert dann die Röhrchen zu einem Luminometergehäuse (6), bei dem auf einmal 100 µl Luciferase/Luciferin-Reagens (z.B. Biotrace HM) unter Verwendung einer computergesteuerten Peristaltikpumpe (7) zur Kontrolle der von der Versorgungseinrichtung (8) abgegebenen Menge zugegeben werden. Der Transport des Röhrchens von der Station für die Zugabe des grenzflächenaktiven Stoffs und von ADP zu der beim Luminometer angeordneten Luciferase/Luciferin-Station dauert mindestens 1 min, was für die Zerstörung der Mikroorganismen und die ATP-Synthese ausreicht.

Nach Zugabe des Luciferase/Luciferin-Reagens bleibt das Röhrchen 70 s in dem Luminometergehäuse; während dieser Zeit werden sieben Meßvorgänge zur Bestimmung der Zahl der Zählimpulse während eines Zeitraums von je 10 s durchge-



führt, wobei der nach 10 s erhaltene kumulierte Wert von dem nach 70 s erhaltenen Wert abgezogen wird, um die Zahl der Zählimpulse pro Minute zu erhalten. Diese Berechnung wird in einem angeschlossenen Computer (9) durchgeführt, in den durch das Luminometer ein Signal (Zählimpulse pro Minute) und Ergebnisse für jedes in den Karussellwagen eingesetzte Röhrchen eingegeben und von einer optischen Anzeigeeinheit (10) angezeigt werden. Auf diese Weise kann der Computer den Zeitpunkt der Abgabe der Reagenzien an ein bestimmtes Röhrchen steuern, so daß gewünschtenfalls die Inkubationszeit variiert werden kann.

Beispiel 7: Erfindungsgemäßer Test-Kit

Ein erfindungsgemäßer Test-Kit besteht aus einem Behälter, der eine gereinigte ADP-Lösung (Reinheit >99,95 %) mit einer Konzentration von 1 mM enthält, die wie in Beispiel 1 oder 2 beschrieben hergestellt wurde (erhöhte Konzentration im Vergleich zu dem in Beispiel 4 beschriebenen Verfahren zur Erhöhung der Empfindlichkeit), einem Behälter, der eine gealterte Luciferase/Luciferin-Lösung (Biotrace HM) enthält, und einem Behälter, der Cetyltrimethylammoniumbromid (0,1 % in Wasser) enthält, die zusammen mit einer Gebrauchsanleitung für die Verwendung dieser Reagenzien bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens verpackt sind. Bei einer Verwendung in mobilen Labors kann die Liefereinheit eine Kunststoffbox mit elastischen Halterungen für jeden Behälter sein, d.h. in Form einer Schaumstofffüllung mit Vertiefungen vorliegen, deren Form der Form der Behälter entspricht.

In der Liefereinheit können wahlweise ein Behälter mit der Lösung eines nichtionischen grenzflächenaktiven Stoffs (Triton X-100, 0,2%ig oder etwas Entsprechendes) und/oder ein Behälter, der eine ATPase wie Apyrase enthält, die zur

04.09.98

Zerstörung des ATPs dient, das durch die Einwirkung des nichtionischen grenzflächenaktiven Stoffs auf eine Probe freigesetzt wird, enthalten sein, wodurch sie für die erneute Untersuchung unter Zugabe des kationischen grenzflächenaktiven Stoffs verwendet werden kann.

Der Phosphatpuffer kann in dem Kit als separater Puffer enthalten sein, kann aber auch in dem Behälter mit dem grenzflächenaktiven Stoff oder mit ADP enthalten sein, insbesondere dann, wenn diese in gebrauchsfertigen Konzentrationen vorliegen. Alternativ kann der Puffer zusammen mit dem grenzflächenaktiven Stoff und/oder dem ADP in einer für die Verdünnung vorgesehenen konzentrierten Lösung enthalten sein.

EP 0 680 515

Ansprüche

1. Verfahren für die Bestimmung der Gegenwart von Mikroorganismen und/oder der Menge dieser Mikroorganismen und/oder des intrazellulären Materials dieser Mikroorganismen in einer Probe, das den Nachweis und/oder die Abschätzung der Menge der darin enthaltenen Adenylatkinase unter Verwendung der Fähigkeit der Adenylatkinase, Adenosindiphosphat (ADP) in Adenosintriphosphat (ATP) umzuwandeln, und die Herstellung eines Zusammenhangs zwischen dieser Umwandlung und der Gegenwart oder der Menge der Mikroorganismen und/oder des intrazellulären Materials dieser Mikroorganismen umfaßt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Probe eine wäßrige Suspension oder eine Lösung ist und die Abschätzung der darin enthaltenen Adenylatkinase durchgeführt wird durch Zugabe von ADP unter Bedingungen, unter denen beliebige vorhandene Adenylatkinase das ADP zu ATP umwandelt, Zugabe von Luciferase und Luciferin, Bestimmung der Menge des von der Probe abgegebenen Lichts und Herstellen eines Zusammenhangs mit der Gegenwart und der Menge der Adenylatkinase.
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das ADP ein ADP/ATP-Verhältnis von 2000/1 oder darüber aufweist.
4. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das ADP das ADP ist, das durch Auftrennen von im Handel erhältlichem ADP hoher Reinheit mit einer Reinheit über 98 % in ADP- und ATP-Fractionen durch Hindurchlaufenlassen durch eine Diethylaminoethylcellulose-Säule und Eluieren mit

0,02 M Chlorwasserstoffsäure bei einer Geschwindigkeit von 1 ml pro Minute erhältlich ist.

5. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das ADP, bezogen auf ATP, eine solche Reinheit aufweist, daß 50 µl einer 1/3000-Verdünnung einer 100-mM-Lösung von ADP eine Zählrate von weniger als 1000 Zählimpulsen pro Minute ergeben, wenn eine Untersuchung mit 100 µl Biotrace Enzyme HM Luciferase- und Luciferinreagens durchgeführt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei für das ADP weniger als 300 Zählimpulse pro Minute gemessen werden, wenn es mit 100 µl Biotrace Enzyme HM Luciferase- und Luciferinreagens untersucht wird.
7. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das ADP, bezogen auf ATP eine Reinheit aufweist, die einem ADP/ATP-Molverhältnis von mehr als 6000 entspricht.
8. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das ADP durch Behandlung von ADP mit einer Reinheit von mehr als 98 % mit einer ATPase während eines Zeitraums, der für die Verringerung des ATP-Gehalts auf 0,1 Mol-% oder darunter ausreicht, erhältlich ist.
9. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Luciferase-Reagens zur Entfernung der Adenylatkinase-Aktivität vorbehandelt worden ist.
10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die in der Luciferase enthaltenen Adenylatkinase durch Größen-Ausschluß-Chromatographie, Umkehrphasenchromatographie oder beide Chromatographieverfahren entfernt worden ist.

11. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Luciferase und/oder das Luciferin unmittelbar bevor oder während der Durchführung der Messungen zugegeben werden, so daß für verunreinigende Adenylatkinase keine ausreichende Zeit verbleibt, einen merklichen Effekt hervorzurufen.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Probe zur Zerstörung aller enthaltenen Mikroorganismen vorbehandelt wird, so daß das intrazelluläre Material freigesetzt oder in anderer Weise den Untersuchungsreagenzien ausgesetzt wird.
13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die Behandlung zur Zerstörung der Mikroorganismen unter Verwendung von grenzflächenaktiven Stoffen durchgeführt wird.
14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei der grenzflächenaktive Stoff einen kationischen grenzflächenaktiven Stoff umfaßt.
15. Verfahren nach Anspruch 13, bei dem die Untersuchung außerdem mit einer Probe durchgeführt wird, die mit einem nichtionischen grenzflächenaktiven Stoff vorbehandelt wurde, und bei dem die Menge des erzeugten ATPs von der Menge ATP abgezogen wird, die bei der Untersuchung unter Verwendung des kationischen grenzflächenaktiven Stoffs erzeugt wird.
16. Vorrichtung für den Nachweis der Gegenwart von Mikroorganismen oder des Zellinhalts dieser Mikroorganismen nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, wobei die Vorrichtung Mittel zur Aufnahme einer in Form einer wäßrigen Suspension vorliegenden Probe, die analysiert werden soll, Mittel für die Zugabe von ADP,

Luciferase und Luciferin zu der Probe, Mittel für den Nachweis von erzeugtem Licht umfaßt, wobei Fördermittel für die Bewegung der Probe und von Einrichtungen relativ zueinander zum Zwecke des sequentiellen Betriebs vorgesehen sind.

17. Vorrichtung nach Anspruch 16, die außerdem Mittel für die Zugabe von grenzflächenaktiven Stoffen zu der Suspension aufweist, die vor den Mitteln für die Zugabe von Luciferase und Luciferin angeordnet sind.
18. Vorrichtung nach Anspruch 17, wobei das ADP-Reagenz mit dem grenzflächenaktiven Stoff zugegeben wird.
19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 16 bis 18, die außerdem eine Station zum Lichtnachweis umfaßt, bei der Luciferase und Luciferin zu der Probe gegeben werden, bevor das von der Probe emittierte Licht mit der Lichtnachweis-Einrichtung gemessen wird.
20. Vorrichtung nach Anspruch 16, die Fördermittel umfaßt, die die Probe halten und ein Volumen flüssiges Medium aufnehmen und die Probe durch eine oder mehrere Stationen für die Zugabe von Reagenzien zu der Lichtnachweis-Einrichtung bewegen.
21. Vorrichtung nach Anspruch 20, die Fördermittel umfaßt, die an die Aufnahme einer Reihe von Luminometer-Gefäßen angepaßt sind, in die vorab eine wäßrige flüssige Suspension eines auf die Gegenwart von Mikroorganismen zu testenden Materials gefüllt wird oder die durch eine Station der Vorrichtung bewegt werden, in der eine derartige Suspension in die Gefäße gegeben wird.

22. Test-Kit für den Nachweis und oder die quantitative Bestimmung von Mikroorganismen nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, der Adenosindiphosphat, Luciferase und Luciferin enthält.
23. Test-Kit nach Anspruch 22, der außerdem einen grenzflächenaktiven Stoff enthält, der zum Zerstören der Zellen der Zielmikroorganismen, für die der Nachweis und/oder die quantitative Bestimmung vorgesehen ist, geeignet ist.
24. Test-Kit nach einem der Ansprüche 22 und 23, der einen kationischen grenzflächenaktiven Stoff und einen nichtionischen grenzflächenaktiven Stoff als Reagenzien enthält.
25. ADP-Reagens zur Verwendung für den Nachweis und/oder die quantitative Bestimmung von Mikroorganismen oder des Zellinhalts dieser Mikroorganismen nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, das ADP mit einer solch großen, auf ATP bezogenen Reinheit enthält, daß das ADP/ATP-Molverhältnis größer als 2000/1 ist.
26. ADP-Reagenz, das ADP nach Anspruch 25 enthält, wobei das ADP/ATP-Molverhältnis größer als oder gleich 99,99/0,01 ist.
27. Test-Kit nach einem der Ansprüche 22 bis 24, wobei das ADP-Reagens ein ADP-Reagens nach einem der Ansprüche 25 und 26 ist.
28. Test-Kit nach einem der Ansprüche 22 bis 24 oder 27, wobei die Luciferase im wesentlichen frei von Adenylatkinase-Aktivität ist.

29. Test-Kit nach einem der Ansprüche 22 bis 24 oder 27, wobei das verwendete Luciferase/Luciferin-Verhältnis oder die in dem Kit enthaltene Gebrauchsanleitung, die sich auf die Verdünnung eines oder mehrerer derartiger Reagenzien bezieht, so ist, daß die Luciferase schnell genug auf das Luciferin-Substrat einzuwirken vermag, so daß die mit der Luciferase assoziierte Adenylatkinase ATP erst nach Beendigung der ersten Messung der Lichtemission erzeugt.

Fig.1

- Frische, nicht gewaschene Zellen
- Frische, gewaschene Zellen
- ▼ Zellen, 3 Tage bei 37 °C gelagert, nicht gewaschen
- ▽ verbrauchtes Medium, von frischen Zellen stammend

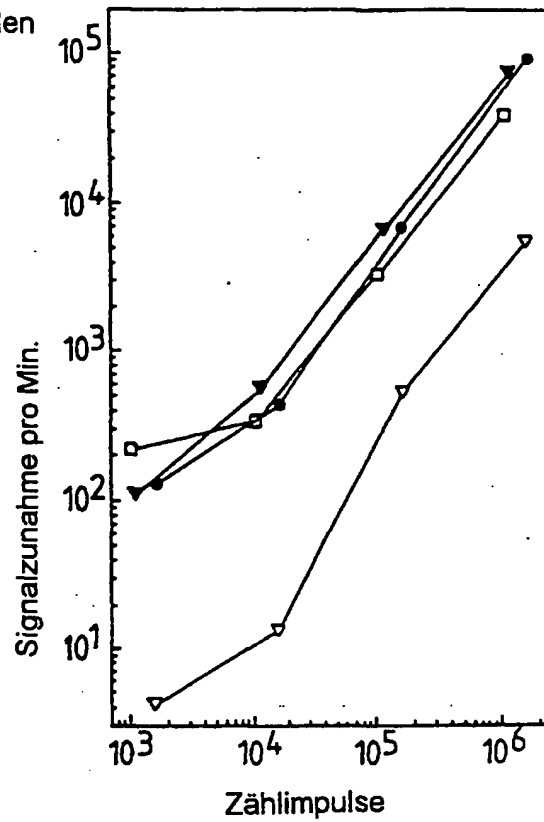


Fig. 2

